

PCT

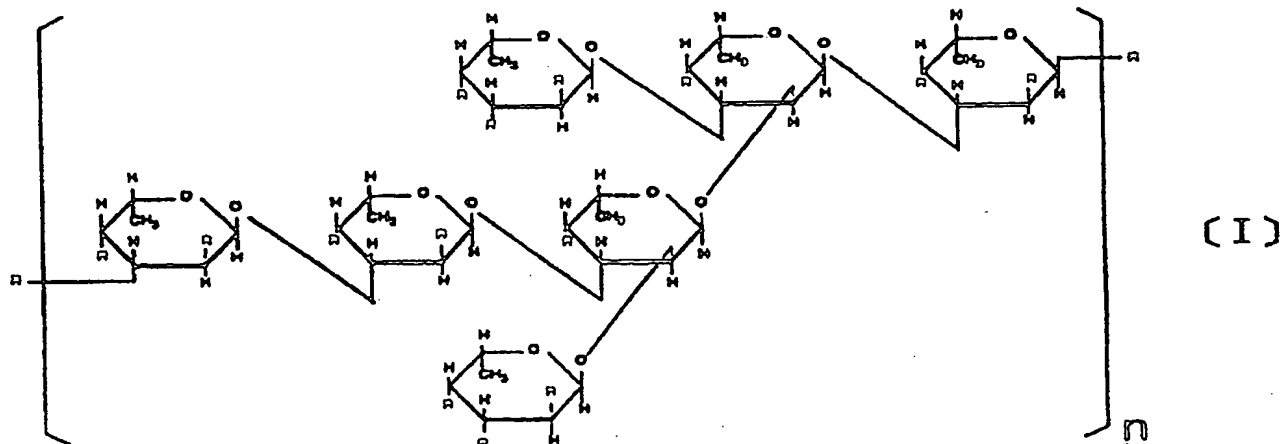
世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C08B 37/00	A1	(11) 国際公開番号 <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 5px; display: inline-block;">AJ</div> (43) 国際公開日 1999年8月19日(19.08.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00606 (22) 国際出願日 1999年2月10日(10.02.99) (30) 優先権データ 特願平10/49989 1998年2月17日(17.02.98) JP 特願平10/125415 1998年4月21日(21.04.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 酒井 武(SAKAI, Takeshi)(JP/JP) 木村ひとみ(KIMURA, Hitomi)(JP/JP) 片山 薫(KATAYAMA, Kaoru)(JP/JP) 〒036-8216 青森県弘前市大字在府町82番地4 寶酒造株式会社 パイオ弘前研究所内 Aomori, (JP) 嶋中一夫(SHIMANAKA, Kazuo)(JP/JP) 猪飼勝重(IKAI, Katsushige)(JP/JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)	(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: SULFATED SACCHARIDES

(54)発明の名称 硫酸化糖

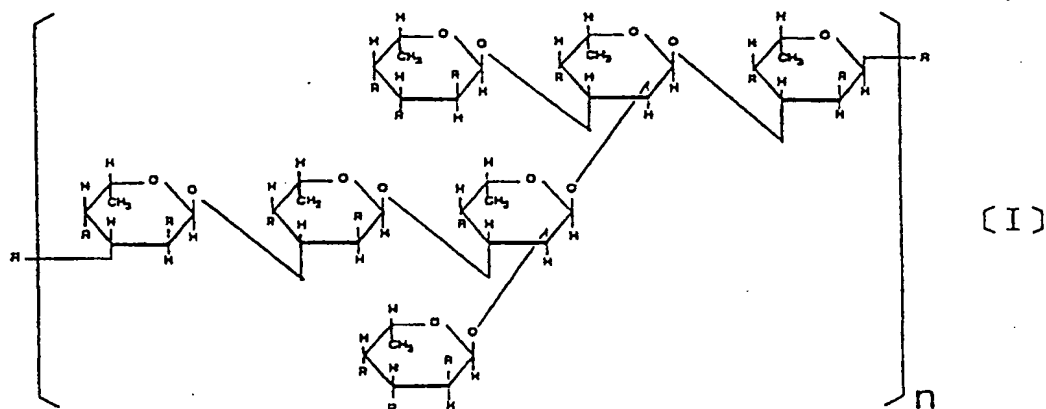


## (57) Abstract

Sulfated saccharides represented by general formula (I); sulfated polysaccharides comprising any of the sulfated saccharides as an essential component of the constituent saccharides; or salts of these, wherein R is OH or OSO<sub>3</sub>H and n is an integer of 1 to 5.

(57)要約

下記一般式〔I〕で表される硫酸化糖若しくは該硫酸化糖を構成糖の必須成分とする硫酸化多糖又はそれらの塩。



(式中、RはOH又はOSO<sub>3</sub>H、nは1～5の整数である)

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	CW	ギニア・ビサオ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

## 明 細 書

### 硫 酸 化 糖

#### 発明の属する技術分野

本発明は医薬品、糖鎖工学研究用試薬、又は化粧品等として有用な海藻由来の硫酸化糖及び硫酸化多糖に関する。

#### 従来技術

褐藻類に属する海藻には硫酸化多糖が含まれていることが知られており、フコース硫酸を構成糖の主成分とするフコイダンの構造は褐藻類の種類によってかなり異なることが報告されている。

また硫酸化多糖由来の硫酸化糖に関しても褐藻類の種類によってかなり異なることが報告されている。

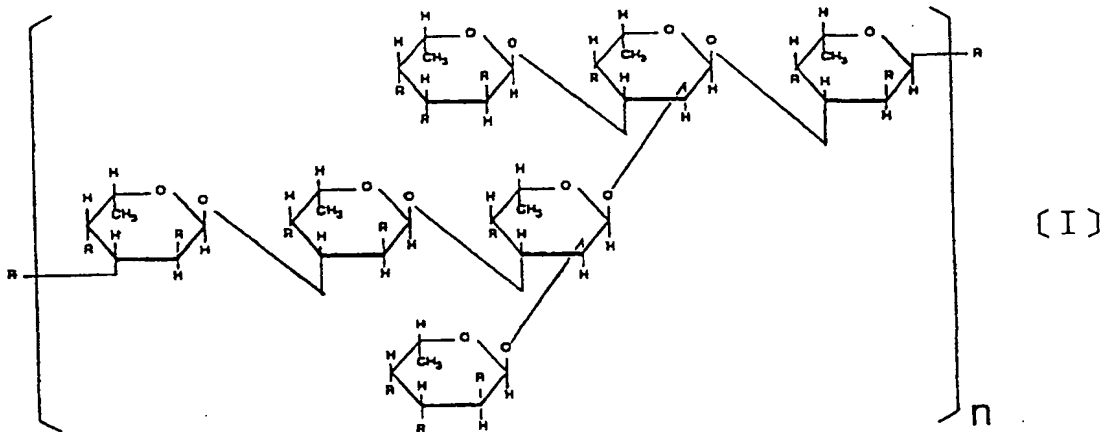
#### 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、試薬、医薬等として有用な新規な構造を有する硫酸化糖及び硫酸化多糖を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、上記目的を達成するために褐藻類由来の硫酸化多糖について鋭意検討した結果、下記一般式〔I〕で表される硫酸化糖を構成糖の必須成分とする硫酸化多糖（以下、単に本発明の硫酸化多糖と称する）及び該硫酸化糖の製造方法を確認し、本発明を完成させた。

本発明を概説すれば、本発明は、下記一般式〔I〕で表される硫酸化糖若しくは該硫酸化糖を構成糖の必須成分とする硫酸化多糖又はそれらの塩に関する。



(式中、RはOH又はOSO<sub>3</sub>H、nは1～5の整数である)

本発明の第2の発明は、藻類からポリ陽イオン物質と硫酸化多糖の架橋の非破壊条件下で抽出する工程を包含することを特徴とするポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖の製造方法に関する。

本発明の第3の発明は、硫酸化多糖溶液に、溶液のpHよりも等電点が高いポリ陽イオン物質を添加することを特徴とするポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖の製造方法に関する。

本発明の第4の発明は、硫酸化多糖にポリ陽イオン物質を添加することを特徴とする硫酸化多糖の粘弾性の増強方法に関する。

本発明の第5の発明は、少なくとも低粘弾性硫酸化多糖とポリ陽イオン物質を含有する組成物に関する。

本発明の第6の発明は、ポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖を有効成分として含有することを特徴とする医薬に関する。

本発明の第7の発明は、ポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖を有効成分として含有することを特徴とする潤滑剤に関する。

本発明の第8の発明は、ポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖を有効成分として含有することを特徴とする化粧品に関する。

図面の簡単な説明

図 1 は硫酸化糖の質量分析の結果を示す図である。

図 2 は硫酸化糖の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す図である。

図 3 は硫酸化糖の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す図である。

図 4 はフラクションナンバー 67 の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す図である。

図 5 は本発明の硫酸化多糖の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す図である。

図 6 は本発明の硫酸化多糖の IR スペクトルを示す図である。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明に関して具体的に説明する。

本発明に使用される褐藻類の種類は本発明の硫酸化多糖を含有すれば良く特に限定はないが、例えばガゴメ昆布、マ昆布、ワカメ、クロメ、アラメ、カジメ、ジャイアントケルプ、レソソニア ニグレセンス等の昆布目海藻は特に本発明の硫酸化多糖を多く含んでおり、原料として好適である。

本発明の硫酸化多糖の製造には、まず褐藻類から水系溶媒により本発明の硫酸化多糖の抽出液を得る。抽出に供する海藻は生海藻でも良いが、抽出液を得る前に褐藻類を乾燥したり、乾燥粉末にしたりしてもよい。

また、その乾燥物を 60～100% のアルコールやアセトン等で洗浄したりすれば、本発明の硫酸化多糖への着色性物質の混入が大幅に減少するため、後の本発明の硫酸化糖の製造に有利である。

本発明の硫酸化多糖の褐藻類からの水系溶媒による抽出は、好ましくはエチルアルコール存在下で行うのが良く、好ましくはエチルアルコール 5～40%、更に好適にはエチルアルコール 8～15% の存在下での水系溶媒により、本発明の硫酸化多糖が選択的に抽出される。

また、褐藻類から本発明の硫酸化多糖を抽出する際に、塩化カルシウムや酢酸カルシウム等、アルギン酸と沈殿を形成する無機塩を使用するとアルギン酸の混入が大幅に減少するため、後の精製に有利である。

本発明の硫酸化多糖の抽出温度は 50℃ 以下が好ましく、好適には 15～30℃ である。

また、抽出の pH は、温度との兼ね合いもあるが、本発明の硫酸化多糖は、酸

やアルカリに対して不安定なので、pH 6～8 程度の中性域での抽出が好ましい。

また抽出はかくはん下で行えば良いが、非せん断の条件下で行うのが最適であり、これらの条件下により、本発明の硫酸化多糖を効率よく得ることができる。

なお上記褐藻類の抽出液には中性糖、タンパク質等の不純物が混入していることが多い。中性糖の除去は通常、排除分子量 10 万以下程度の限外ろ過により容易に達成できる。タンパク質の除去には、プロテアーゼ処理等が有効である。

本発明の硫酸化多糖から低分子物質である本発明の硫酸化糖を製造する際には、上記硫酸化多糖に、該多糖に選択的に作用し本発明の硫酸化糖を遊離させる作用を有するエンド型硫酸化多糖分解酵素を作用させれば良い。該エンド型硫酸化多糖分解酵素としては特に限定はないが、その一例としては後述の実施例 1 - (1) に記載のアルテロモナス (*Alteromonas*) sp. SN-1009 (FERM BP-5747) の生産するエンド型硫酸化多糖分解酵素を使用すればよい。

本発明の硫酸化多糖に上記エンド型硫酸化多糖分解酵素を作用させた後、得られる反応生成物はそのまま使用することも可能であるが、薬品や試薬として使用する場合、反応液中から本発明の硫酸化糖を精製することが望ましい。精製に際しては、限外ろ過法、陰イオン交換樹脂や、疎水性クロマト用樹脂、ゲルろ過用樹脂等を用いれば良い。

本発明の硫酸化糖は生褐藻類に上記エンド型硫酸化多糖分解酵素を直接作用させて得られる分解物中より精製しても良く、乾燥海藻、アルコール洗浄海藻、本発明の硫酸化多糖含有物等に上記エンド型硫酸化多糖分解酵素を作用させ、得られる分解物中より精製しても良い。なお上記酵素反応時には反応溶液中から本発明の硫酸化糖を分離する工程を組合せることにより、本発明の硫酸化糖の生成効率が上昇する。

本発明の硫酸化糖としては一般式〔I〕において  $n = 1 \sim 5$  の各硫酸化糖等が例示されるが、本発明の硫酸化多糖に上記エンド型硫酸化多糖分解酵素を作用させる場合の酵素作用条件により種々の分子量の硫酸化糖を調製することができ、

得られた各硫酸化糖を例えばゲルろ過法や限外ろ過法を用いて分子量分画し、分画物中より各硫酸化糖を上記精製手段で単離することができる。ゲルろ過法の例としては、セルロファインGCL-300を使用し、例えば分子量25000超、分子量25000～10000超、分子量10000～5000超等の任意の分子量画分を調製でき、セルロファインGCL-90を用い、例えば分子量20000以下の画分を分子量20000～15000超、分子量15000～10000超、分子量10000～5000超等の任意の分子量画分を調製できる。

限外ろ過法としては、例えば限外ろ過膜や限外ろ過用ホロファイバーを用いることにより、分子量分画を行うことができ、例えばダイセル社製FE10-FUS0382を用いることにより分子量30000以下の画分を、同FE-FUS-653を用いることにより分子量6000以下の画分を調製することができ、これらのゲルろ過法、限外ろ過法を組合せることにより、任意の分子量分画物を調製することができ、調製物より目的の硫酸化糖を単離することができる。したがって本発明の硫酸化糖は一般式〔I〕において $n=5$ 超の硫酸化糖を包含するものである。

本発明の硫酸化多糖及び本発明の硫酸化糖の塩としては、医薬的に許容される塩があり、公知の方法にて変換することができる。

本発明により得られた硫酸化糖若しくは硫酸化多糖又はそれらの塩はフコース残基の含有率、その硫酸化度が極めて高く、フコース硫酸含有多糖の構造研究用試薬として、またフコース硫酸含有多糖の生理機能研究用試薬として有用である。

なお、本発明の硫酸化糖及び本発明の硫酸化多糖の硫酸基について述べれば、硫酸基の数は硫酸化多糖の抽出条件、硫酸化糖の製造条件によって変動し得るものである。例えば硫酸基のエステル結合は一般に酸に弱く、またフコースの2位、3位に結合している硫酸エステルはアルカリに弱い。すなわち本発明の硫酸化糖及び本発明の硫酸化多糖の硫酸基の数は特に限定されるものではなく、条件を設定することにより任意の硫酸基含量とすることができる。

本発明の硫酸化糖若しくは硫酸化多糖又はそれらの塩はフコース残基のメチル

基による疎水性を併せ持つため、様々な塩基性有機物やタンパク質に高い親和性を有する。したがって本発明の硫酸化糖若しくは硫酸化多糖又はそれらの塩は保水性が優れているだけでなく、その疎水性や荷電等のため例えば肌の角質層への親和性が高く、本発明の硫酸化糖若しくは硫酸化多糖又はそれらの塩は化粧料の素材として極めて有用である。

本発明の硫酸化糖若しくは硫酸化多糖又はそれらの塩は化粧料として使用可能な任意の物質と混合して使用可能である。一般的には、水、アルコール類、油脂類、脂肪酸類、グリセロール、無機塩類、防腐剤、界面活性剤、ビタミン類、アミノ酸類、糖類等と混合し、ローション、乳液、クリーム等として使用できる。

本発明の硫酸化多糖含有物は、例えばガゴメ昆布、マ昆布、ワカメ、クロメ、ジャイアントケルプ、レソニア ニグレセンス等の褐藻類の生海藻や乾燥海藻或いはそれらをエタノール等の有機溶媒を60%以上含む溶液で洗浄したもの（以下、これらを海藻原料と称す）から、抽出する。抽出液は例えば、水、塩化カリウムや塩化ナトリウム等の塩類及び／又は40%以下のエタノール等の有機溶媒を含む水溶液等を用いることができる。例えば、上記の海藻原料を上記の抽出液中に浸漬し、50℃以下で放置、あるいはかくはんすることにより、本発明の硫酸化多糖含有物を製造することができる。本発明の硫酸化多糖含有物とは、本発明の硫酸化糖を構成糖の必須成分とする硫酸化多糖を含有すれば限定はなく、得られた硫酸化多糖含有物中には、本発明の硫酸化多糖以外にも、多糖類、アルギン酸、アミノ酸類、糖アルコール類、油脂類、無機塩類、タンパク類等を含有しても良い。本発明の硫酸化多糖含有物は本発明の硫酸化多糖の生理活性により、ウイルス阻害作用、受精阻害作用、抗炎症作用、血管内皮肥厚抑制作用、血栓形成抑制作用、脂血清澄作用、血清コレステロール低下作用、抗アレルギー作用等を示し、医薬品の原料として有用である。本発明の硫酸化多糖含有物は本発明の硫酸化多糖の生理活性により、保湿作用、メラニン色素合成阻害作用等を示し、化粧料の原料として有用である。本発明の硫酸化多糖含有物中に含有される本発明の硫酸化多糖の一例としては、フコースを構成糖とし、フコース1分子当たりおよそ2分子の硫酸基を含む硫酸化多糖がある。当該硫酸化多糖の硫酸基には



、海水中あるいは抽出液中に存在する陽イオン、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン、鉄等が対イオンとして結合しうる。通常、海藻から抽出した当該硫酸化多糖は、海藻由来のタンパク質によって架橋されており、強い粘弾性を示すのでゲルろ過法による分子量測定は不適當であるが、例えば、1 M以上の塩化ナトリウム等の高塩濃度下で、1時間以上かくはんすれば、その架橋を解離させることができ、ゲルろ過法で当該硫酸化多糖の分子量を測定することができ、プルランを標準物質とした場合、分子量は約一千万の測定値となる。

また本発明の硫酸化多糖含有物としては、藻類からポリ陽イオン物質と硫酸化多糖の架橋の非破壊条件下で抽出する工程を包含する製造方法で製造されるポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖又は硫酸化多糖の溶液に、溶液のpHよりも等電点が高いポリ陽イオン物質を添加することによって製造されるポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖等も包含される。

硫酸化多糖はその性質として吸水性、保水性、粘性、曳糸性、粘弾性等が挙げられるが、これらの性質は例えば原料からの抽出条件の僅かな差により大きく変動する。これらの性質は化粧品や潤滑剤、保湿剤として使用する際に非常に有用な性質であるが、これまで、再現性良く硫酸化多糖を製造したり、これらの性質をコントロールすることは困難であった。

すなわち、硫酸化多糖を化粧品や潤滑剤、保湿剤又はある種の医薬品等として利用する場合はその吸水性、保水性、粘弾性等の再現性が良くないと、使用感や、性能の再現性も無くなり商品化時に大きな問題となっていたが、本発明により、吸水性、保水性、粘弾性等の安定した本発明の硫酸化多糖含有物、その製造方法及びその用途が提供される。

すなわち、本発明者らは本発明の硫酸化多糖とタンパク質等のポリ陽イオンとの相互作用について鋭意検討し、硫酸化多糖がある条件下でポリ陽イオン物質と共存すると著しく粘弾性が高まることを見出した。

また、本発明者らは褐藻類に含まれる硫酸化多糖は、天然の形では褐藻類が持つタンパク質と架橋をしており、ある条件下ではその架橋を維持したまま粘弾性

の高い硫酸化多糖含有物として得られることを見出した。

本発明において、硫酸化多糖とは特に限定されるものではなく、フコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ラムナン硫酸、コンドロイチン硫酸等の硫酸化多糖が例示される。

また本発明においてポリ陽イオン物質とは特に限定されるものではなく、タンパク質やポリペプチド、ポリアミン、ポリエチレンジアミン、ポリグルコサミン、ポリガラクトサミン等のポリ陽イオン物質が包含される。

硫酸化多糖とポリ陽イオン物質を架橋させる際、使用する硫酸化多糖の等電点よりも高いpHで、使用するポリ陽イオン物質の等電点よりも低いpHで、共存する電解質の濃度は使用する硫酸化多糖とポリ陽イオン物質の架橋を妨げない程度に低く、添加するポリ陽イオン物質量は硫酸化多糖の総荷電を中和するよりも少ないという条件下でポリ陽イオン物質で架橋した硫酸化多糖は、その粘弾性が著しく高まる。

ポリ陽イオン物質として、ゼラチンやコラーゲンの様に等電点の比較的高いタンパク質を使用する場合は、正の荷電が多く硫酸化多糖を架橋しやすいので、粘弾性を付与し易い。しかし、等電点が比較的低いタンパク質でも、硫酸化多糖溶液のpHを使用するタンパク質の等電点よりも下げれば、ゼラチンやコラーゲンのように硫酸化多糖に強い粘弾性を付与することができる。

本発明のポリ陽イオン物質で架橋した硫酸化多糖は、藻類より調製することができる。例えば褐藻類に含まれているフコース硫酸含有硫酸化多糖は抽出する方法により抽出効率や性質がかなり異なる。

単に短時間で大量のフコース硫酸含有硫酸化多糖を得る目的の場合は、海藻を粉碎し、水あるいは酸、塩、アルカリ等の水溶液により加熱かくはん抽出すれば容易にフコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出することができる。

しかしながらこうして得られたフコース硫酸含有硫酸化多糖は、藻類内に存在していた形態と比較すると分子量が小さく粘弾性もほとんどない。したがって化粧品として使用した場合硫酸化多糖の効能はあるが使用感にぬめりや潤滑性等の特徴はなく、潤滑剤としての使用もほとんど不可能である。

ところが、藻類を50℃以下、好ましくは30℃以下程度で、水あるいは中性付近の水溶液に浸し、かくはん速度も、せん断力がほとんど生じない様な速度で、例えば抽出された粘弾性の強い物質が藻類から引きはがされない程度に設定すると、フコース硫酸含有硫酸化多糖は藻類中のタンパク質で架橋した形態で抽出される。

このタンパク質で架橋されたフコース硫酸含有硫酸化多糖は新鮮鶏卵白様の性質すなわち粘弾性を呈する。

タンパク質とフコース硫酸含有硫酸化多糖の架橋は比較的容易に解離する。タンパク質で架橋されたフコース硫酸含有硫酸化多糖は、かくはんするとかくはん軸を伝って液が巻き上がってくるが（ワイセンベルク効果）、長時間せん断力が強くかかるかくはんを継続すると粘弾性が低下し、液面はかくはん軸に接する部分でむしろ窪む様になる。また加熱や高濃度の塩類の添加、プロテアーゼ処理等によっても、タンパク質とフコース硫酸含有硫酸化多糖の架橋は解離し、その粘弾性は消失する。

すなわち、上記のように抽出されたタンパク質で架橋されたフコース硫酸含有硫酸化多糖の強い粘弾性はフコース硫酸含有硫酸化多糖そのものが持っているのではなく、フコース硫酸含有硫酸化多糖とタンパク質が架橋しているときに存在する性質である。

したがって、一度、粘弾性を喪失したフコース硫酸含有硫酸化多糖について、粘弾性を回復させることも可能であり、該フコース硫酸含有硫酸化多糖にタンパク質等のポリ陽イオン物質を添加すると容易に粘弾性を回復することができる。タンパク質等のポリ陽イオン物質の添加量により粘弾性の強度も自在に調整できる。すなわち本発明により、硫酸化多糖にポリ陽イオン物質を添加することを特徴とする硫酸化多糖の粘弾性を増強する方法が提供される。

例えば、タンパク質等のポリ陽イオン物質の等電点よりやや低いpHの環境で硫酸化多糖、例えばフコース硫酸含有硫酸化多糖の荷電が中和されない程度の量混合すれば、タンパク質等のポリ陽イオン物質の混合量とフコース硫酸含有硫酸化多糖溶液の粘弾性には正の相関がある。

当然のことながら、硫酸化多糖、例えばフコース硫酸含有硫酸化多糖溶液のpHが、加えるポリ陽イオン物質の等電点よりもはるかに低かったり、加えるポリ陽イオン物質の量がフコース硫酸含有硫酸化多糖の荷電を中和させてしまう量の場合は、沈殿が形成され粘弾性は低下する。

タンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖を得るために使用される海藻は特に限定されるものではなく、ガゴメ昆布、とろろ昆布、ま昆布、カジメ、アラメ、ワカメ、モズク、オキナワモズク等フコース硫酸含有硫酸化多糖を含む褐藻類ならどんな種類でも使用することができる。

褐藻類も生海藻、乾燥海藻、塩漬海藻等どんな形態でも使用できる。

本発明の、タンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出する前に、60～100%程度のアルコール等で海藻を洗浄すると、海藻に付着した塩類、着色性物質等を除去できる。本発明の、タンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出する際には、水、塩類を含む水、アルコール類を含む水など様々な溶媒が使用できるが、塩類はフコース硫酸含有硫酸化多糖とタンパク質の架橋を解離させその粘弾性を下げる働きがあるので、塩類は100mM以下が好ましい。またアルコール類は30%以下が好ましい。

抽出温度は50℃以下が好ましく、好適には5～30℃が好ましい。抽出時のかくはんはなくてもよいが、抽出液が静止していると、抽出時間が長時間必要となる。かくはんする際には、上述したようにタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖の粘弾性が必要以上低下しないようにかくはん速度を選べば良い。ただし、かくはん速度よりもせん断力の強さの方が粘弾性に与える影響はるかに大きいので、低かくはん速度で非せん断の条件下で抽出するのが好ましい。

なおかくはんにより低下した粘弾性を回復させるにはポリ陽イオン物質、例えばゼラチン、コラーゲン等を添加すれば良い。

すなわち低粘弾性硫酸化多糖にポリ陽イオンを添加することにより硫酸化多糖の粘弾性が増強し、構成成分として、低粘弾性硫酸化多糖とポリ陽イオン物質を少なくとも含有する組成物が提供され、該組成物は粘弾性の強い組成物として、化粧料、潤滑剤等の種々の用途に有用である。

本発明のポリ陽イオン物質で架橋した硫酸化多糖は、抽出液をそのまま使用しても良いが、更に精製して使用しても良い。

本発明のポリ陽イオン物質で架橋した硫酸化多糖を有効成分として含有する医薬、例えば本発明のポリ陽イオン物質で架橋した硫酸化多糖を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば口内用剤を製造することができる。

本発明の口内用剤は、例えば、だ液の分泌が不十分で口腔が乾燥して口の開閉等が不自由なとき口に含むと症状が極めて改善される。

また、本発明のポリ陽イオンで架橋した硫酸化多糖は潤滑剤としても使用することができる。本発明の潤滑剤は非常に滑らかで極めて良好な潤滑作用を有し、様々な医療器具あるいは医薬品等を肛門あるいは膣に挿入する際など極めて良好な潤滑作用を示す。また、性交時やマッサージの際の潤滑剤としても使用することができる。

本発明のポリ陽イオン物質で架橋した硫酸化多糖は化粧料として使用可能な任意の物質と混合して使用可能である。一般的には、水、アルコール類、油脂類、脂肪酸類、グリセロール、無機塩類、防腐剤、界面活性剤、ビタミン類、アミノ酸類、糖類等と混合し、ローション、乳液、クリーム等として使用できる。

本発明のポリ陽イオンで架橋した酸性多糖は化粧品として使用するとその粘弾性のため滑らかな使い心地で使用感が良く、しかも肌に塗布したときはそのぬめりは瞬時にして肌に吸着されるという性質をもつ。使用後のべたつきもなく化粧品として非常に好ましい性質である。この性質は硫酸化多糖としてフコース硫酸含有硫酸化多糖を用いた場合、特に上記の好ましい性質が顕著である。

本発明の硫酸化糖、本発明の硫酸化多糖は抗原として使用することができる。抗体の作製は常法によりおこなわれるが、例えば本発明の硫酸化糖又は本発明の硫酸化多糖をアジュバンドとともにウサギ等の動物に免疫することによって、ポリクローナル抗体を調製することができる。またモノクローナル抗体は抗原を免疫して得られた抗体産生B細胞とメラノーマ細胞を融合し、目的の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、この細胞を培養することによって調製することができる。これらの抗体は本発明の硫酸化糖、本発明の硫酸化多糖の精製に使用する

ことができる。また海藻中の本発明の硫酸化多糖の同定に使用することができる。例えば、本発明の抗体を使用し、海藻抽出液中の本発明の硫酸化多糖含量を容易に測定でき、高含有抽出液を効率よく調製することが可能になる。例えばガゴメ昆布、レッソニア ニグレセンス、マ昆布等の抽出液中には本発明の硫酸化多糖が高含有されていることが判明し、本発明の硫酸化多糖の工業的製造を効率よく行うことができる。また、本発明の硫酸化糖、本発明の硫酸化多糖を認識する抗体は、本発明の硫酸化糖、本発明の硫酸化多糖の生理機能の解明に有用であり、例えば本発明の硫酸化糖、本発明の硫酸化多糖の受精阻害作用機作、ウイルス感染阻害機作、生体内での代謝等の解析に有用である。

本発明の硫酸化糖は糖鎖工学用物質として有用であり、特公平 5-65108 号公報記載の方法により 2-アミノピリジル化 (PA 化) を行い、PA 化物を調製すれば、糖鎖工学用物質として極めて有用な物質を提供することができる。

更に、本発明の硫酸化糖及び／又は本発明の硫酸化多糖を有効成分とし、抗ガン剤、がん転移抑制剤、抗ウイルス剤、受精阻害剤、抗炎症剤、血管内皮肥厚抑制剤、血栓形成抑制剤、脂血清澄剤、血清コレステロール低下剤等の医薬品を製造することができ、これらの医薬品の投与を必要とする疾病の治療又は予防に使用することができる。また本発明の硫酸化多糖含有物も、これらの医薬品原料として使用できる。なお本発明の硫酸化糖、本発明の硫酸化多糖、本発明の硫酸化多糖含有物から選択されるものを含有、希釈及び／又は添加してなる、上記生理活性を有する食品又は飲料を提供することができる。また本発明の硫酸化糖、本発明の硫酸化多糖、本発明の硫酸化多糖含有物から選択されるものを有効成分とする化粧品を提供することができる。

#### 実施例

以下に本発明を実施例によって更に具体的に示すが、本発明は以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

#### 実施例 1

(1) アルテロモナス sp. SN-1009 (FERM BP-5747) を、グルコース 0.25%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05

%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー社製）pH 8.2からなる培地600mlを分注して殺菌した（120℃、20分間）2リットルの三角フラスコに接種し、25℃で26時間培養して種培養液とした。ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.02%、下記実施例2に記載の硫酸化多糖 0.2%、及び消泡剤（信越化学工業社製KM70）0.01%を含む人工海水pH 8.0からなる培地20リットルを30リットル容のジャーファメンターに入れて120℃、20分間殺菌した。冷却後、上記の種培養液600mlを接種し、24℃で24時間、毎分10リットルの通気量と毎分250回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。得られた培養上清を、排除分子量1万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により濃縮後85%飽和硫酸塩析し、生じた沈殿を遠心分離により集め、10分の1濃度の人工海水を含む20mMのトリス塩酸緩衝液（pH 8.2）に対して充分透析し、600mlの本発明の硫酸化多糖に選択的に作用するエンド型硫酸化多糖分解酵素液を調製した。

（2）乾燥したガゴメ昆布2Kgを直径1mmのスクリーンを装着させたカッターミル（増幸産業社製）により粉碎し、得られた昆布のチップを20リットルの80%エタノール中に懸濁し、25℃で3時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、30mlの上記実施例1-（1）で調製したエンド型硫酸化多糖分解酵素、10%のエタノール、100mMの塩化ナトリウム、50mMの塩化カルシウム、及び50mMのイミダゾールを含む20リットルの緩衝液（pH 8.2）に懸濁し、25℃で48時間かくはんした。この懸濁液を網目の直径32μmのステンレス金網でろ過し、残渣を50mMの塩化カルシウムを含む10%のエタノールで洗浄した。更にその残渣を10リットルの50mM塩化カルシウムを含む10%のエタノール中に懸濁し、3時間かくはん後、ステンレス金網でろ過、洗浄した。更にその残渣を同条件で懸濁後、16時間かくはんし、直径32μmのステンレス金網でろ過、洗浄した。

こうして得られたろ液及び洗浄液を集め、排除分子量3000のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過し、ろ過液と非ろ過液に分離した。

このろ過液をロータリーエバポレーターで約3リットルに濃縮後、遠心分離して上清を得た。得られた上清を排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、この溶液に0.1Mとなるように酢酸カルシウムを添加し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清をあらかじめ50mMの酢酸カルシウムにより平衡化させたDEAE-セルロファイン（樹脂量4リットル）にかけ、50mMの酢酸カルシウム及び50mMの塩化ナトリウムで充分洗浄後、50mM～800mMの塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させた。この時の分取量は1本当り500mlで行った。分取した画分をセルロースアセテート膜電気泳動法〔アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第37巻、第197～202頁(1970)〕により分析したところ塩化ナトリウム濃度が約0.4Mで溶出される硫酸化糖（フラクションナンバー63付近）が均一であることが判明した。また、約0.6Mの濃度で溶出される硫酸化糖（フラクションナンバー67付近）も電気泳動的にほぼ均一であった。

そこで、まずフラクションナンバー63の液を150mlに濃縮後、濃度が4Mとなるように塩化ナトリウムを添加し、あらかじめ4Mの塩化ナトリウムにより平衡化したPhenyl-セルロファイン（樹脂量200ml）にかけ、4Mの塩化ナトリウムにより充分洗浄した。非吸着性の硫酸化糖画分を集め、排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、脱塩液505mlを得た。

得られた脱塩液のうち40mlを10%のエタノールを含む0.2Mの塩化ナトリウムによって平衡化させたセルロファインGCL-90のカラム（4.1cm×87cm）にかけて、ゲルろ過を行った。分取は1フラクション当り9.2mlで行った。

全フラクションに対して総糖量の分析をフェノール硫酸法〔アナリティカル ケミストリー (Analytical Chemistry)、第28巻、第350頁(1956)〕により行った。

この結果、硫酸化糖は1つのピークを形成したので、そのピークの中央部分、



フラクションナンバー 63～70 を集め、排除分子量 300 の膜を装着させた電気透析器により脱塩後、凍結乾燥し、112 mg の本発明の硫酸化糖の乾燥品を得た。

乾燥品の一部を取り糖組成分析及び質量分析を行った。

また、乾燥品のうちの 10 mg を常法により重水置換し、NMR 分析に供した。

。

糖組成分析の結果、本硫酸化糖はフコースのみからなる硫酸化糖であることが判明した。

API-III 質量分析機（パーキンエルマー・サイエクス社）を用いた、硫酸化糖の質量分析の結果を図 1 に示し、以下に解析結果を示す。すなわち図 1 は硫酸化糖の質量分析の結果を示す図であり、縦軸は相対強度（%）を、横軸は  $m/z$  値を示す。

分子量は、全硫酸基がナトリウム塩になっている状態で  $2264 \pm 1$  という結果が得られた。つまり、構成糖がフコースだけの硫酸化糖であることから、フコースが 7 分子、硫酸基が 12 分子結合したもので、その硫酸基がすべてナトリウム塩になっているもので、理論的分子量は 2265 であることが判明した。

つまり、本物質を M とすると、図 1 中の主なシグナルは下記のように帰属することができる。

$m/z$	1109.05	---	$[M - 2Na^+]^{2-}$	(理論値 1109.5)
	731.45	---	$[M - 3Na^+]^{3-}$	(理論値 732)
	542.75	---	$[M - 4Na^+]^{4-}$	(理論値 543.25)
	430.05	---	$[M - 5Na^+]^{5-}$	(理論値 430)

この結果、本物質はフコース 7 分子、硫酸基 12 分子のオリゴ糖である。

次に、フコースの結合様式、及び硫酸基の結合位置を決定するために、JNM- $\alpha$ 500 型核磁気共鳴装置（日本電子社製）を用い、NMR 分析を行った。構成糖の結合様式は  $^1H$ -検出異種核検出法である HMB C 法を用いて行った。 $^1H$ -NMR の帰属には DQF-COSY 法及び HOHAHA 法を、 $^{13}C$ -NMR の帰属には HSQC 法を用いた。

NMRの帰属の結果を以下に示し、本発明の硫酸化糖の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを図2に、 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを図3にそれぞれ示した。但し、 $^1\text{H}$ -NMRでの化学シフト値はジオキサンの化学シフト値を3.53 ppmに、 $^{13}\text{C}$ -NMRではジオキサンの化学シフト値を66.5 ppmとして表した。測定は両方共に60°Cで行った。すなわち図2は本発明の硫酸化糖の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図であり、図3は本発明の硫酸化糖の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。図2、図3において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

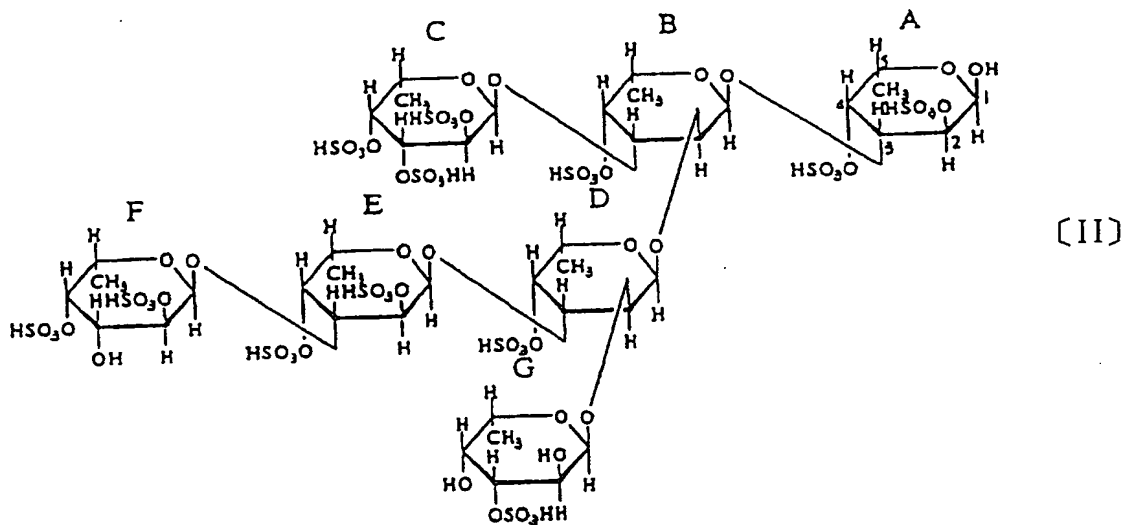
$\delta$  5.30 (1H, d,  $J=3.1\text{ Hz}$ , A-1-H)、5.23 (1H, d,  $J=3.4\text{ Hz}$ , B-1-H)、5.20 (1H, d,  $J=3.4\text{ Hz}$ , E-1-H)、5.19 (1H, d,  $J=3.7\text{ Hz}$ , F-1-H)、5.18 (1H, d,  $J=2.8\text{ Hz}$ , C-1-H)、5.16 (1H, br-s, D-1-H)、5.09 (1H, d,  $J=4.3\text{ Hz}$ , G-1-H)、4.72 (1H, d,  $J=2.4\text{ Hz}$ , B-4-H)、4.67 (1H, t,  $J=2.3\text{ Hz}$ , A-4-H)、4.65 (1H, m, E-4-H)、4.64 (1H, m, D-4-H)、4.62 (1H, m, C-4-H)、4.49 (1H, d,  $J=3.1\text{ Hz}$ , F-4-H)、4.37 (1H, m, E-2-H)、4.36 (1H, m, G-3-H)、4.35 (1H, m, C-2-H)、4.33 (1H, m, B-2-H)、4.32 (1H, m, C-3-H)、4.30 (1H, m, A-2-H)、4.27 (1H, m, F-2-H)、4.27 (1H, m, F-5-H)、4.25 (1H, m, D-5-H)、4.24 (1H, m, C-5-H)、4.21 (1H, m, E-5-H)、4.18 (1H, m, B-3-H)、4.18 (1H, m, F-3-H)、4.17 (1H, m, A-3-H)、4.17 (1H, m, E-3-H)、4.16 (1H, m, D-3-H)、4.14 (1H, m, A-5-H)、4.10 (1H, m, B-5-H)、3.98 (1H, m, D-2-H)、3.97 (1H, m, G-4-H)、3.96 (1H, m, G-5-H)、3.78 (1H, d-d,  $J=4.3, 10.4\text{ Hz}$ , G-2-H)

H)、1.34 (3H, d,  $J=7.0\text{ Hz}$ , D-5-CH<sub>3</sub> のH<sub>3</sub>)、1.15 (3H, d,  $J=6.7\text{ Hz}$ , E-5-CH<sub>3</sub> のH<sub>3</sub>)、1.12 (3H, d,  $J=6.7\text{ Hz}$ , A-5-CH<sub>3</sub> のH<sub>3</sub>)、1.11 (3H, d,  $J=6.7\text{ Hz}$ , C-5-CH<sub>3</sub> のH<sub>3</sub>)、1.08 (3H, d,  $J=6.7\text{ Hz}$ , B-5-CH<sub>3</sub> のH<sub>3</sub>)、1.06 (3H, d,  $J=6.4\text{ Hz}$ , F-5-CH<sub>3</sub> のH<sub>3</sub>)、1.04 (3H, d,  $J=6.7\text{ Hz}$ , G-5-CH<sub>3</sub> のH<sub>3</sub>)

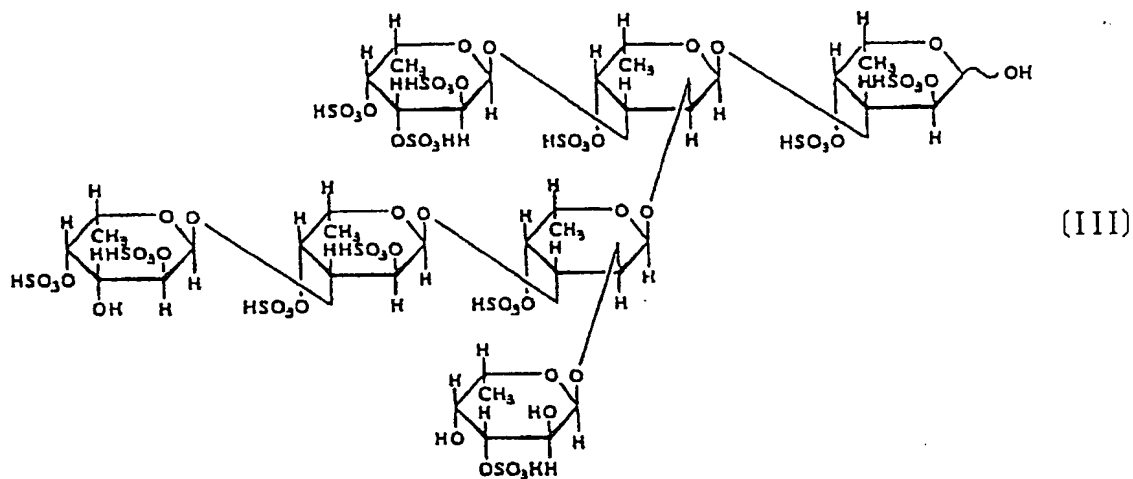
<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O)

δ 99.2 (G-1-C)、98.9 (C-1-C)、98.3 (B-1-C)、97.1 (E-1-C)、94.6 (F-1-C)、89.3 (A-1-C)、89.3 (D-1-C)、81.3 (F-4-C)、80.6 (B-4-C)、78.6 (A-4-C)、77.9 (G-3-C)、77.5 (C-4-C)、77.4 (E-4-C)、75.9 (B-3-C)、75.4 (A-2-C)、74.8 (F-2-C)、74.5 (B-2-C)、74.2 (D-3-C)、73.9 (A-3-C)、73.9 (D-2-C)、73.6 (C-2-C)、73.0 (D-4-C)、73.0 (E-2-C)、70.9 (C-3-C)、70.6 (D-5-C)、70.1 (G-4-C)、69.9 (E-3-C)、68.0 (B-5-C)、67.5 (A-5-C)、67.5 (E-5-C)、66.9 (C-5-C)、66.7 (G-5-C)、66.5 (F-3-C)、66.3 (F-5-C)、65.6 (G-2-C)、16.0 (C-5-CH<sub>3</sub> のC)、15.9 (B-5-CH<sub>3</sub> のC)、15.8 (E-5-CH<sub>3</sub> のC)、15.8 (F-5-CH<sub>3</sub> のC)、15.4 (G-5-CH<sub>3</sub> のC)、15.3 (A-5-CH<sub>3</sub> のC)、13.1 (D-5-CH<sub>3</sub> のC)

なお、NMRのピークの帰属の番号は下記式〔II〕の通りである。



以上の結果より、本物質は下記式〔III〕で表される硫酸化糖であることが判明した。



(3) 実施例 1 - (2) に記載した、DEAE-セルロファインのフラクションナンバー 67 に関しても 63 と全く同様に精製して凍結乾燥品を得た。

この標品は、HPLC による分析の結果 63 よりも分子量の大きな硫酸化糖であることが判明したが、NMR の分析結果によると 63 とほぼ同じスペクトルが得られた。

図4にフラクションナンバー67の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した。但し、溶媒は重水を用い、 $^1\text{H-NMR}$ での化学シフト値はジオキサンの化学シフト値を3.53 ppmとして表した。測定は60℃で行った。すなわち図4はフラクションナンバー67の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す図であり、縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値(ppm)を示す。

この結果、フラクションナンバー67は63が数分子結合した構造を持つことが強く示唆された。そこで、フラクションナンバー67を実施例1-(1)記載のエンド型硫酸化多糖分解酵素により分解して分解物をHPLCにより分析したところ、反応生成物の多くが実施例1-(2)に記載したDEAE-セルロファインのフラクションナンバー63から得た硫酸化糖と同じ位置に溶出されてきた。

なお、HPLCの分析条件は下記の通りである。

カラム Shodex SB802.5

カラム温度 25℃

溶液 5 mMのアジ化ナトリウムを含む50 mMの塩化ナトリウム

検出 示差屈折率検出器 Shodex RI-71

上記フラクションナンバー67、63につきプルラン(昭和電工社製)を標準物質としたゲルろ過法により分子量を測定したところ、63はプルラン換算で分子量約8500、フラクションナンバー67は分子量約26000であり、フラクションナンバー67はフラクションナンバー63の硫酸化糖の3量体であることが判明した。

また7糖残基の繰り返しの結合位置はフラクションナンバー67の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを詳細に検討することにより、式〔II〕中のFのフコースの3位に $\alpha-(1\rightarrow3)$ 結合でつながっていることが明らかとなった。

また上記の方法に準じ、本発明の硫酸化多糖の分解物中より、〔III〕で表される硫酸化糖の5量体、すなわち一般式〔I〕において $n=5$ で表される硫酸化糖を得た。

実施例2

(1) 乾燥したガゴメ昆布 2 Kg を直径 1 mm のスクリーンを装着させたカッターミル（増幸産業社製）により粉碎し、得られた昆布のチップを 20 リットルの 80 % エタノール中に懸濁し、25 °C で 3 時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、95 °C に加温した 40 リットルの 50 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 に懸濁し、時々かくはんしながら 95 °C で 2 時間処理し、硫酸化多糖を抽出した。

抽出液中の懸濁物を、ろ過し、ろ液を調製した後、ろ過残渣を 3.5 リットルの 100 mM 塩化ナトリウムにより洗浄し、更にろ液を得た。

両ろ液を合わせた後、30 °C まで温度を下げ、3000 U のアルギン酸リアーゼ（ナガセ生化学工業社製）を添加後、エタノールを 4 リットル加え 25 °C で 24 時間かくはんした。次に遠心分離を行い、得られた上清を排除分子量 10 万のホロファイバーを備えた限外ろ過器により 4 リットルに濃縮し、更に、10 % のエタノールを含む 100 mM の塩化ナトリウムにより、着色性物質がろ過されなくなるまで限外ろ過を続けた。

非ろ過液中に生じた沈殿は遠心分離により除去し、この上清を 5 °C まで温度を下げ、0.5 N 塩酸により pH を 2.0 とした後、生じたタンパク質等の沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を速やかに 1 N 水酸化ナトリウムにより pH を 8.0 とした。

次に、排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過器により限外ろ過を行い、20 mM 塩化ナトリウム pH 8.0 により完全に溶媒置換後、再度 pH を 8.0 とし、遠心分離後、凍結乾燥を行い、約 95 g の硫酸化多糖を調製した。

(2) 実施例 2 - (1) 記載の硫酸化多糖の乾燥標品 10 g をとり、100 mM の塩化ナトリウム、50 mM の塩化カルシウム、50 mM のイミダゾールを含む緩衝液 pH 8.0 に溶解し、20 ml の実施例 1 - (1) に記載のエンド型硫酸化多糖分解酵素を添加して 25 °C で 24 時間反応後、反応液を排除分子量 3500 の透析チューブで充分透析し、透析液（低分子物）を濃縮後、排除分子量 300 の膜を装着した電気透析器により脱塩し、このうちの一部をセルロファイブ

GCL-90 (4.1 × 87 cm) によりゲルろ過した。分取量は1本当たり10 mlで行った。

このフラクションナンバー63番付近をセルロースアセテート膜電気泳動及びHPLCにより分析した結果、実施例1-(2)に記載の式〔III〕で表される構造を持った硫酸化糖と同じ挙動を示すことが判明し、硫酸化多糖から式〔III〕で表される硫酸化糖を調製した。また同様に、式〔III〕で表される硫酸化糖の3量体、5量体、すなわち一般式〔I〕において $n=3, 5$ でそれぞれ表される硫酸化糖を得た。

### 実施例3

実施例2-(1)に記載の硫酸化多糖を1リットル当たり5グラムとなるように、100 mMの塩化ナトリウム、50 mMの塩化カルシウム、及び50 mMのイミダゾールを含む緩衝液pH 8.0に溶解した液を10リットル調製した。この硫酸化多糖溶液2リットルに30 mlの実施例1-(1)に記載のエンド型硫酸化多糖分解酵素を添加して、排除分子量3000の限外ろ過用ホロファイバーを装着させた限外ろ過機にかけ、25℃でろ過速度を1時間当たり200 mlとして運転した。運転中酵素反応溶液には、ろ過された液量と同量の上記硫酸化多糖溶液を添加した。硫酸化多糖溶液が添加された後には、上記の緩衝液のみを同様に添加した。

以下実施例1-(2)と同様に、ろ過液を濃縮後遠心分離して上清を得、次いでこの上清を脱塩後、酢酸カルシウムにより沈殿を形成させ、遠心分離により上清を得た。得られた上清について実施例1-(2)と同様にDEAE-セルロフアインにより精製し、式〔III〕で表される硫酸化糖を調製した。

### 実施例4

ガゴメ昆布500 gを細断し、10リットルの80%エタノールで洗浄後、50リットルの1 mM塩化カリウムを含有する10%エタノール中にて、25℃で3日間攪拌し、網目の直径32  $\mu$ mのステンレス金網でろ過して、本発明の硫酸化多糖の抽出物を得た。

該抽出物を100 mlとり、排除分子量12000の透析用チューブに入れて

5 リットルの水に対して 2 回透析を行った。非透析画分を凍結乾燥し、本発明の硫酸化多糖を得、該硫酸化多糖の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (図 5)、赤外吸収 (IR) スペクトル (図 6) を測定した。すなわち図 5 は本発明の硫酸化多糖の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示す図であり、縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。但し、溶媒は重水を用い、 $^1\text{H-NMR}$  での化学シフト値は HOD の化学シフト値を 4.65 ppm として表した。また図 6 は本発明の硫酸化多糖の KBr 法による IR スペクトルを示す図であり、縦軸は透過率 (%)、横軸は波数 ( $\text{cm}^{-1}$ ) を示す。なお IR スペクトルは FTIR-8000PC 赤外分光光度計 (島津製作所製) を用い測定した。

図 5 に示されるように本発明の硫酸化多糖の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは、図 4 で示される硫酸化糖の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルとほぼ同一であり、本発明の硫酸化多糖は一般式〔I〕で表される硫酸化糖を構成糖の必須成分とする硫酸化多糖である。

本発明の硫酸化多糖の抽出物に、4 M の塩化ナトリウムを添加し強かくはん下混合し、終濃度を 1 M 塩化ナトリウム溶液とし、これを HPLC により分析し、本発明の硫酸化多糖の分子量を測定した。本発明の硫酸化多糖はプルラン標準物質の分子量換算で平均分子量約 1300 万であった。HPLC の条件は下記の通りである。

装置：L-6200 型 HPLC (日立製作所製)

カラム：Shodex SB-806HQ (8×300 mm) (昭和電気社製)

溶離液：50 mM 塩化ナトリウム

流速：示差屈折率検出器 Shodex RI-71 (昭和電気社製)

カラム温度：25℃

また本発明の硫酸化多糖溶液に実施例 1—(1) 記載のエンド型硫酸化多糖分解酵素を作用させたところ一般式〔I〕で表される硫酸化糖が検出された。

#### 実施例 5

ガゴメ昆布 500 g を細断し、10 リットルの 80% エタノールで洗浄後、50 リットルの 1 mM 塩化カリウムを含有する 10% エタノール中にて内径 40 c



mの容器で25℃で2日間、1分当り200回転の速度でかくはんし、本発明の海藻のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出した。抽出物は強い粘弾性を呈し、かくはん軸を伝って抽出液が巻き上げられるワイセンベルク効果を呈した。

通常ガゴメ昆布のフコース硫酸含有硫酸化多糖含量は最大でも乾燥海藻の5%程度であるから、本抽出液のフコース硫酸含有硫酸化多糖濃度は、最大でも0.05%である。

しかし、市販のフコース硫酸含有硫酸化多糖（フコイダン：シグマ社製）の水溶液は、0.05%はもとより、2%にまで濃度を上げてても全く粘弾性を呈さず、本発明の海藻のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖とは異なる性質であった。

本抽出液中のタンパク質量を、プロテインアッセイ（バイオラッド社製）により測定したところ7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

本抽出液にアクチナーゼE（タンパク質分解酵素、科研製薬社製）を0.1  $\text{mg}/\text{ml}$ の濃度で作用させるとその粘弾性が極度に低下した。

また、本抽出液5  $\text{ml}$ に実施例1-(1)に示したアルテロモナス sp. SN-1009 (FERM BP-5747)の生産するエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素含有液を10  $\mu\text{l}$ 添加し作用させると、その粘弾性が完全に消失した。

以上の結果から、褐藻類の抽出物の粘弾性を担っているのはタンパク質で架橋されたフコース硫酸含有硫酸化多糖であること及び褐藻類のフコース硫酸含有硫酸化多糖を特殊な条件で抽出すると、本発明のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖が効率良く抽出できることが判明した。

得られた抽出液を皮膚に塗布すると、最初強いぬめりがあるが、軽く擦り込めばぬめりが肌に吸着され、べたつきもなく、肌はしっとりとし、肌を整える化粧品として極めて有効なものであることも判明した。

#### 実施例6

(1) ガゴメ昆布50  $\text{g}$ を細断し、2リットルの80%エタノールで洗浄後、

5 リットルの 1 mM 塩化カリウム及び 0.075 % のエチルパラベンを含む水溶液中にて内径 20 cm の容器で 25 °C で 2 日間、1 分当り 200 回転の速度でかくはんし、本発明のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出した。

抽出物は強い粘弾性を呈し、かくはん軸を伝って抽出液が巻き上げられるワイセンベルク効果を呈した。この抽出液の性質は実施例 5 の抽出液と同等であった。本抽出液はエタノールに過敏な肌を持つ人の化粧品として有効である。

(2) 乾燥したガゴメ昆布 2 Kg を直径 1 mm のスクリーンを装着させたカッターミル（増幸産業製）により粉碎し、得られた昆布のチップを 20 リットルの 80 % エタノール中に懸濁し、25 °C で 3 時間かくはんし、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、95 °C に加温した 40 リットルの 50 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 に懸濁し、時々かくはんしながら 95 °C で 2 時間処理し、フコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出した。

抽出液中の懸濁物を、ろ過し、ろ液を調製した後、ろ過残渣を 3.5 リットルの 100 mM 塩化ナトリウムにより洗浄し、更にろ液を得た。こうして得られた抽出液を 25 °C まで冷却した。本抽出液は実施例 5 及び実施例 6 - (1) にそれぞれ記載の抽出液より多くのフコース硫酸含有硫酸化多糖を含んでいるが粘弾性を呈さなかった。また、本抽出液は排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により充分脱塩後にも強い粘弾性を呈することはなかった。しかしながら硫酸化多糖特有の粘性は呈した。すなわち、抽出温度が高すぎると本発明のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖は調製できないことが判明した。

(3) ガゴメ昆布 500 g を細断し、10 リットルの 80 % エタノールで洗浄後、50 リットルの 1 mM 塩化カリウムを含有する 10 % エタノール中にて内径 40 cm の容器で 25 °C で 2 日間、1 分間当り 800 回転の速度でかくはんし、フコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出した。抽出物の粘弾性は弱く、かくはん時もワイセンベルク効果を呈さなかった。この抽出液は、肌に塗布時、フコース硫酸

含有硫酸化多糖特有のしっとりさせ効果はあるものの、本発明のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖のもつ特有のぬめりがほとんどなく、使用感は全く別物であった。しかしながら、含有タンパク質濃度は $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、実施例5の抽出液と同じであった。この結果、かくはん速度が速ざると、すなわち、かくはん時にせん断力が強く加わるとタンパク質とフコース硫酸含有硫酸化多糖の架橋が破壊されることが判明した。

(4) 実施例6-(1)で得られた抽出液を内径20cmの容器で1分間当り600回転のかくはん速度で室温で18時間かくはんを行ったところ、相対粘弾性値が2.0から1.2に低下した。粘弾性が低くなったフコース硫酸含有硫酸化多糖溶液に様々な量の1%のゼラチン水溶液を添加したところ、粘弾性が回復した。粘弾性とゼラチンの終濃度の関係を下記表1に示す。

下記表1において粘弾性は相対値で示しており、被検液を内径2mmのシリコンチューブから重力により垂直に流し、出口の下方1~5cm程度のところでガラス棒により流れ落ちる被検液を水平方向に押したとき、流れが切断されことなく押されうる最大距離(cm)をもって相対粘弾性値とした。なお、被検液の液面から被検液の出口までの距離は20~21cmであり、水の相対粘弾性値は0であった。

表 1

ゼラチン終濃度 (%)	相対粘弾性
0	1.2
0.01	1.8
0.012	1.8
0.02	3.5
0.03	1.5
0.05	0

上記の結果から、本発明の海藻のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸

化多糖はせん断力の強いかくはんによりその粘弾性が低下するが、適当なpHや塩濃度の条件下で適当量のゼラチンを添加することによってその粘弾性を回復することができることが判明し、粘弾物を得ることができた。なお、粘弾物は透明なゼリー様の外観を有するゾル状の性状のものである。

また、ゼラチンの添加量が多すぎると粘弾性は消失するので、フコース硫酸含有硫酸化多糖の量に応じて増減する必要があることも判明した。

#### 実施例 7

だ液の分泌が不十分なため口腔の乾燥が甚だしく、口の開閉にも不自由する80歳の女性において、これまで何を使用しても症状の改善が見られなかったが、実施例5の抽出液を口腔に使用したところ、口腔の乾燥、口唇のひび割れ等が改善され、口の開閉の不自由さが著しく改善された。また、3カ月以上の連続使用を行ってもその効果は続いた。

#### 実施例 8

(1) ガゴメ昆布500gを細断し、10リットルの80%エタノールで洗浄後、50リットルの1mM塩化カリウムを含有する10%エタノール中にて内径40cmの容器で25℃で2日間、1分当たり120回転の速度でかくはんし、本発明の海藻のタンパク質で架橋したフコース硫酸含有硫酸化多糖を抽出した。抽出物は強い粘弾性を呈し、かくはん軸を伝って抽出液が巻き上げられるワイセンベルク効果を呈した。抽出物を網目32 $\mu$ mのステンレス金網でろ過し、高粘弾性フコース硫酸含有硫酸化多糖溶液を調製した。

該フコース硫酸含有硫酸化多糖溶液46リットルに、1gのパームオイル（花王社製：化粧品用）を1リットルのエタノールに溶解したパームオイル溶液1リットルをかくはんしながら添加し、更に1リットルのグリセロールを添加し、化粧水を調製した。本化粧水は高粘弾性フコース硫酸含有硫酸化多糖の保湿効果とパームオイルの乾燥防止効果を合わせ持ち、界面活性剤を添加することなくパームオイルが均一に効率よく分散され、油分のべたつきがなく、のびの良い使用感の良い化粧水となった。またパームオイルの代わりにヤシ油（花王社製：化粧品用）を使用し、同様に化粧水を製造した。この化粧水も使用感の良い、化粧水で

あった。

(2) 実施例 6 - (3) で調製した抽出液に、終濃度が 0.02% となるようにゼラチン及び香料を添加しゼラチン使用の化粧水を得た。また同様にコラーゲンを添加しコラーゲン使用の化粧水を得た。それぞれの化粧料は高粘弾性のフコース硫酸含有硫酸化多糖を含有し、添加タンパク質との相乗作用により、保湿性に優れたのびのよい化粧水となった。

以上、上記の化粧水を使用するとその粘弾性のため滑らかな使い心地で使用感が良く、しかも肌に適量を塗布したときはそのぬめりは瞬時にして肌に吸着されるという性質を有した。また使用後のべたつきもなく化粧品として非常に好ましい性質であった。

#### 実施例 9

実施例 4 で調製した本発明の硫酸化多糖の抽出物を、化粧水として使用した。この化粧水は滑らかな使い心地で使用感が良く、しかも肌に塗布したとき、そのぬめりは瞬時にして肌に吸着されるという性質を有した。また使用後のべたつきもなく化粧品として非常に好ましい性質であった。また、本化粧水を使用した場合、手の甲や顔面のしみが薄くなるという効果を示した。

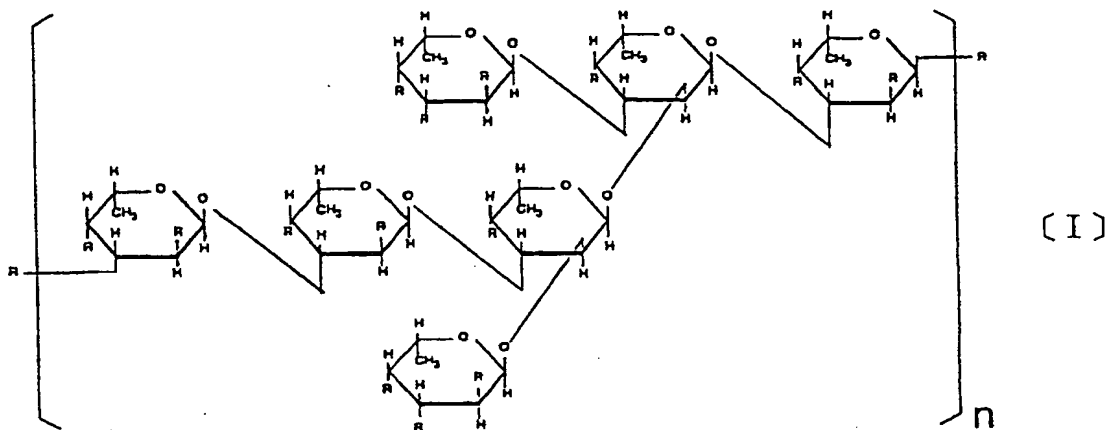
#### 発明の効果

本発明により医薬品、あるいは糖鎖工学研究用試薬として有用な硫酸化糖若しくは硫酸化多糖又はそれらの塩が提供された。この硫酸化糖若しくは硫酸化多糖又はそれらの塩はその保水性等により化粧料の素材として極めて有用である。

また本発明により、高い粘弾性を有する硫酸化多糖及びその製造方法が提供される。また該高粘弾性硫酸化多糖を有効成分として含有する医薬、化粧料も提供される。本発明の医薬は例えば口内用剤として有用である。また本発明の高粘弾性硫酸化多糖は保水性及び潤滑性が優れているだけでなく、その疎水性のため肌の角質層への親和性が高く肌へのなじみも極めてよく、本発明の硫酸化多糖、特に高粘弾性のフコース硫酸含有多糖は化粧料の素材として極めて有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記一般式〔I〕で表される硫酸化糖若しくは該硫酸化糖を構成糖の必須成分とする硫酸化多糖又はそれらの塩。



(式中、RはOH又はOSO<sub>3</sub>H、nは1～5の整数である)

2. 硫酸化多糖が昆布目海藻より得ることができる請求の範囲1記載の硫酸化多糖。
3. 硫酸化多糖がポリ陽イオン物質で架橋されている請求の範囲1又は2記載の硫酸化多糖。
4. ポリ陽イオン物質がタンパク質である請求の範囲3記載の硫酸化多糖。
5. タンパク質が藻類由来タンパク質及び／又は藻類由来タンパク質以外のタンパク質である請求の範囲4記載の硫酸化多糖。
6. タンパク質がコラーゲン及び／又はゼラチンである請求の範囲5記載の硫酸化多糖。
7. 藻類からポリ陽イオン物質と硫酸化多糖の架橋の非破壊条件下で抽出する工程を包含することを特徴とするポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖の製造方法。
8. 硫酸化多糖溶液に、溶液のpHよりも等電点が高いポリ陽イオン物質を添加することを特徴とするポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖の製造方法。

9. 硫酸化多糖にポリ陽イオン物質を添加することを特徴とする硫酸化多糖の粘弾性の増強方法。
10. 少なくとも低粘弾性硫酸化多糖とポリ陽イオン物質を含有する組成物。
11. ポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖を有効成分として含有することを特徴とする医薬。
12. 医薬が口内用剤である請求の範囲 1 1 記載の医薬。
13. ポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖を有効成分として含有することを特徴とする潤滑剤。
14. ポリ陽イオン物質で架橋された硫酸化多糖を有効成分として含有することを特徴とする化粧品。

図 1

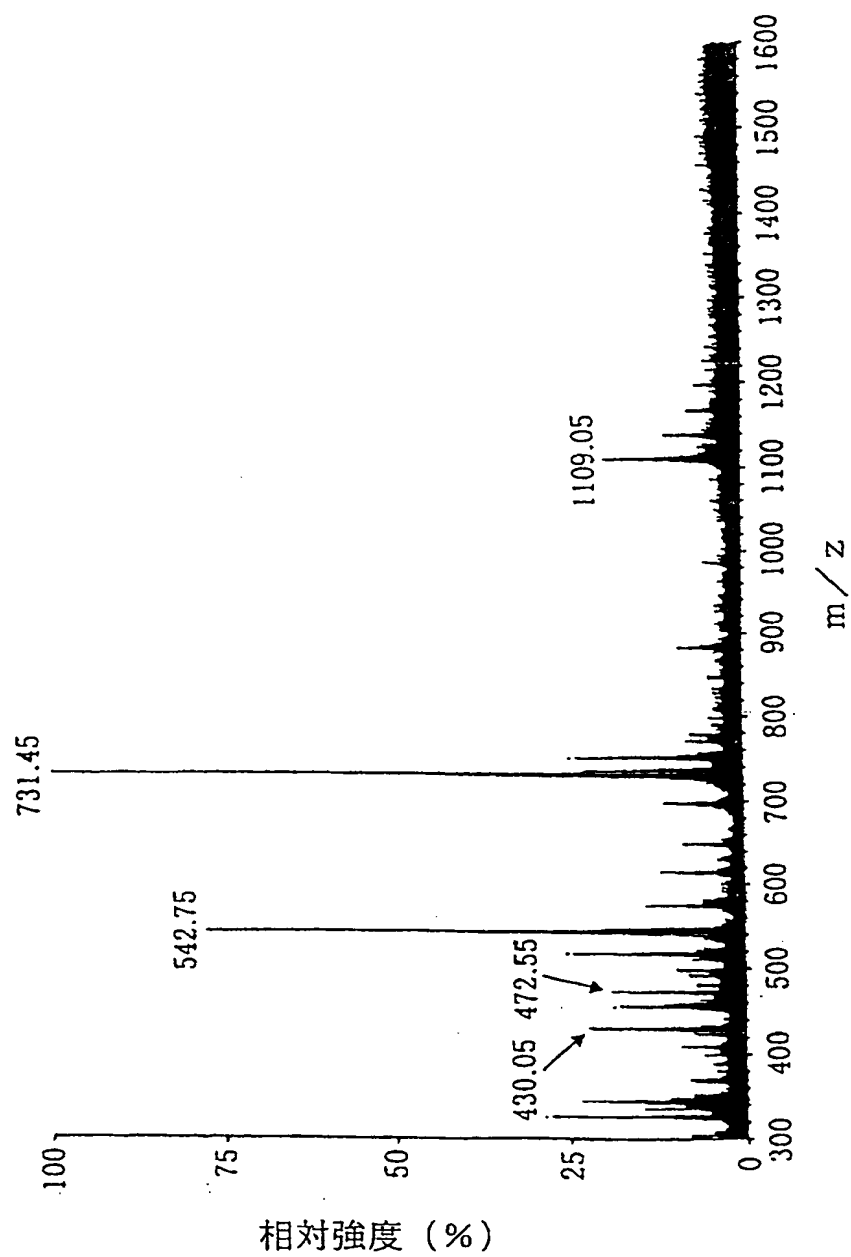
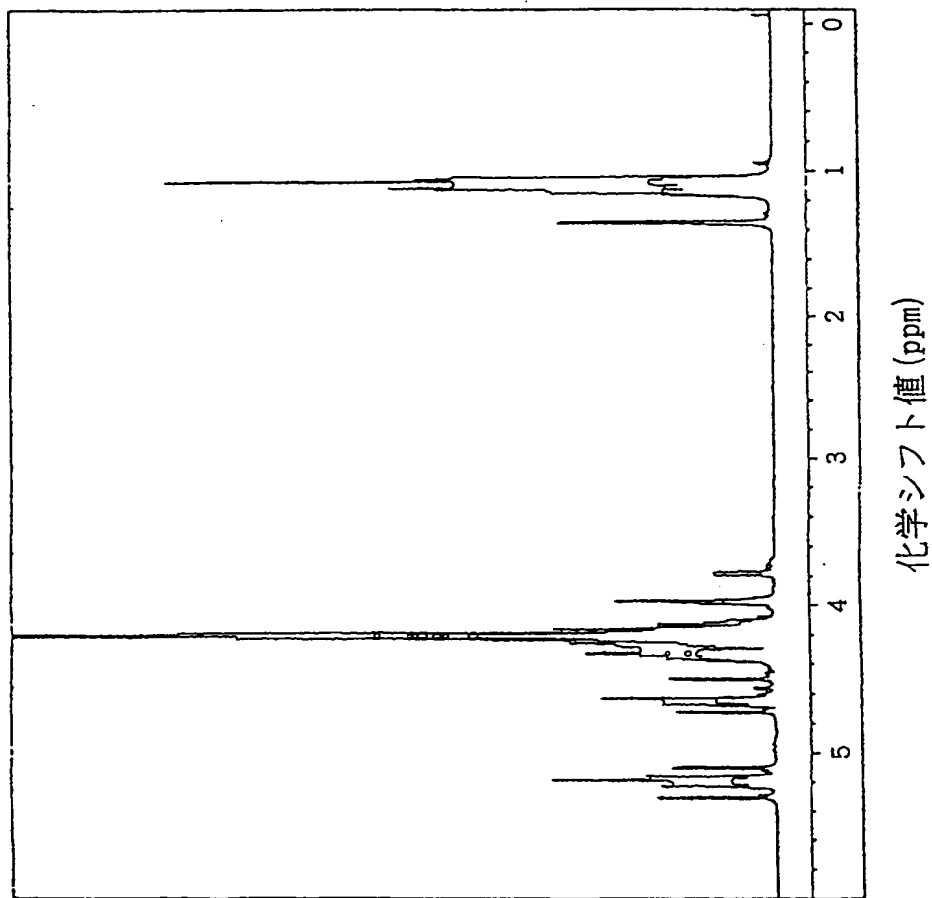




図 2



シグナルの強度

図 3

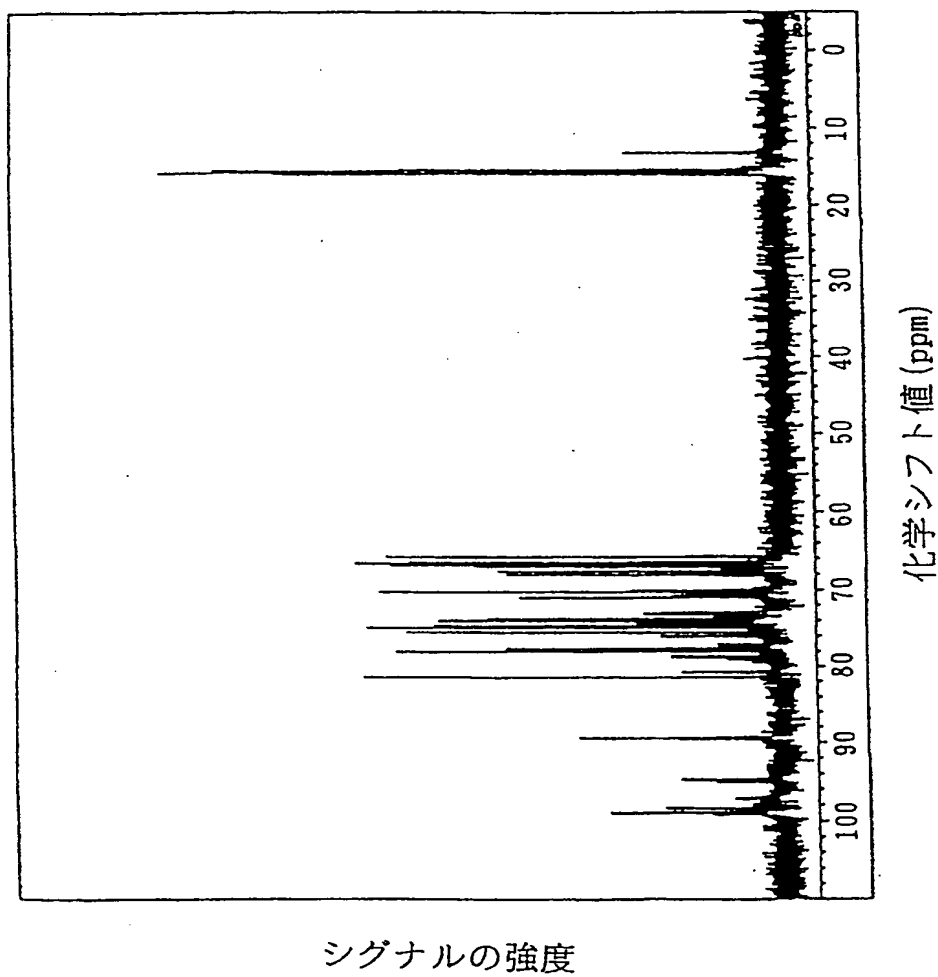


図 4

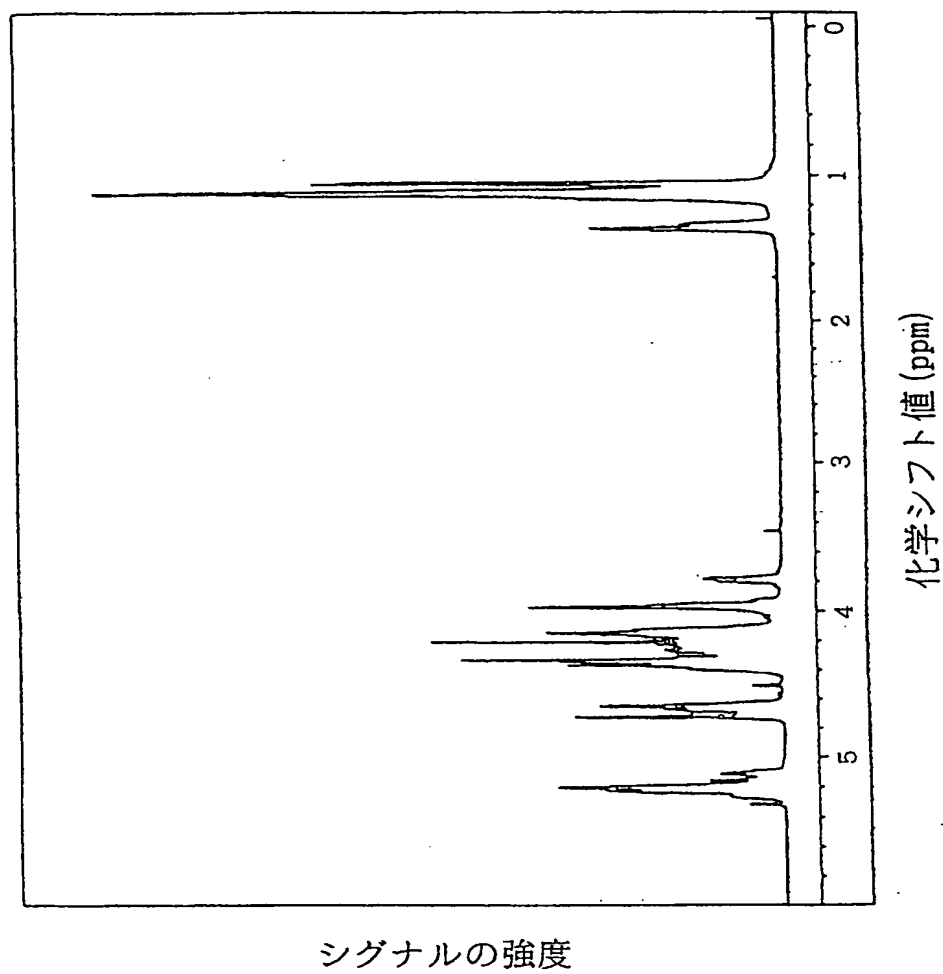


図 5

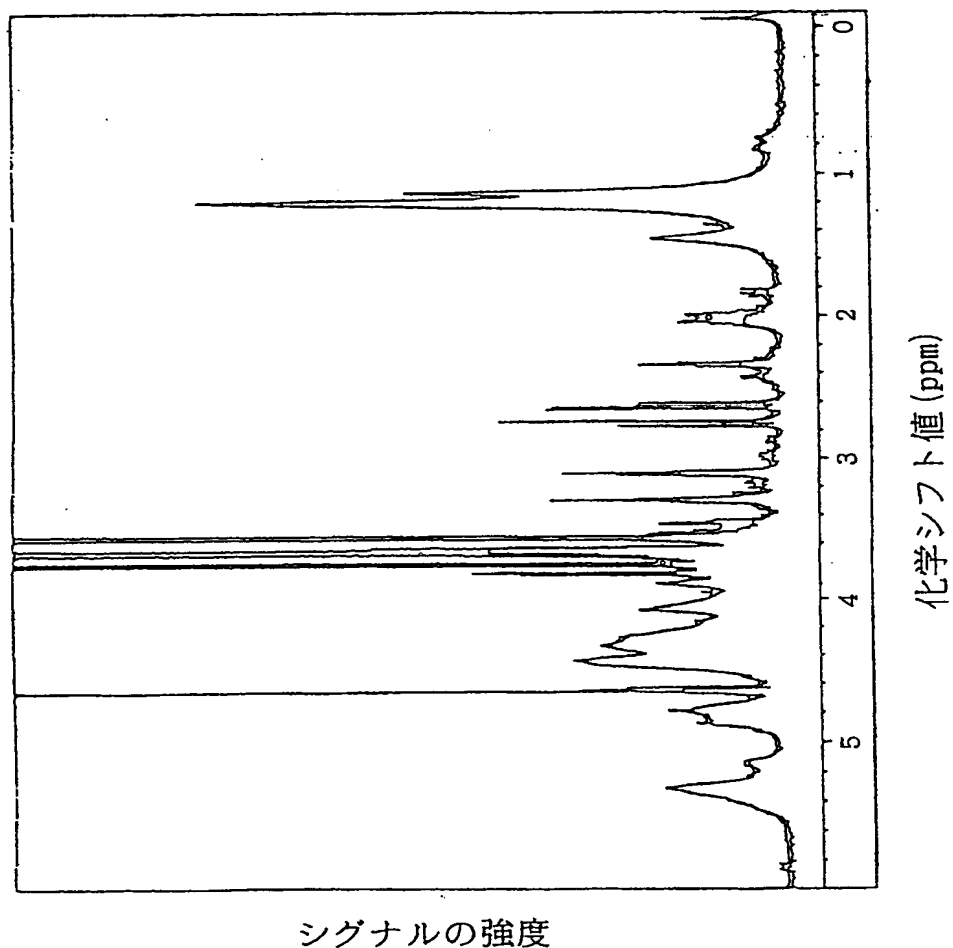
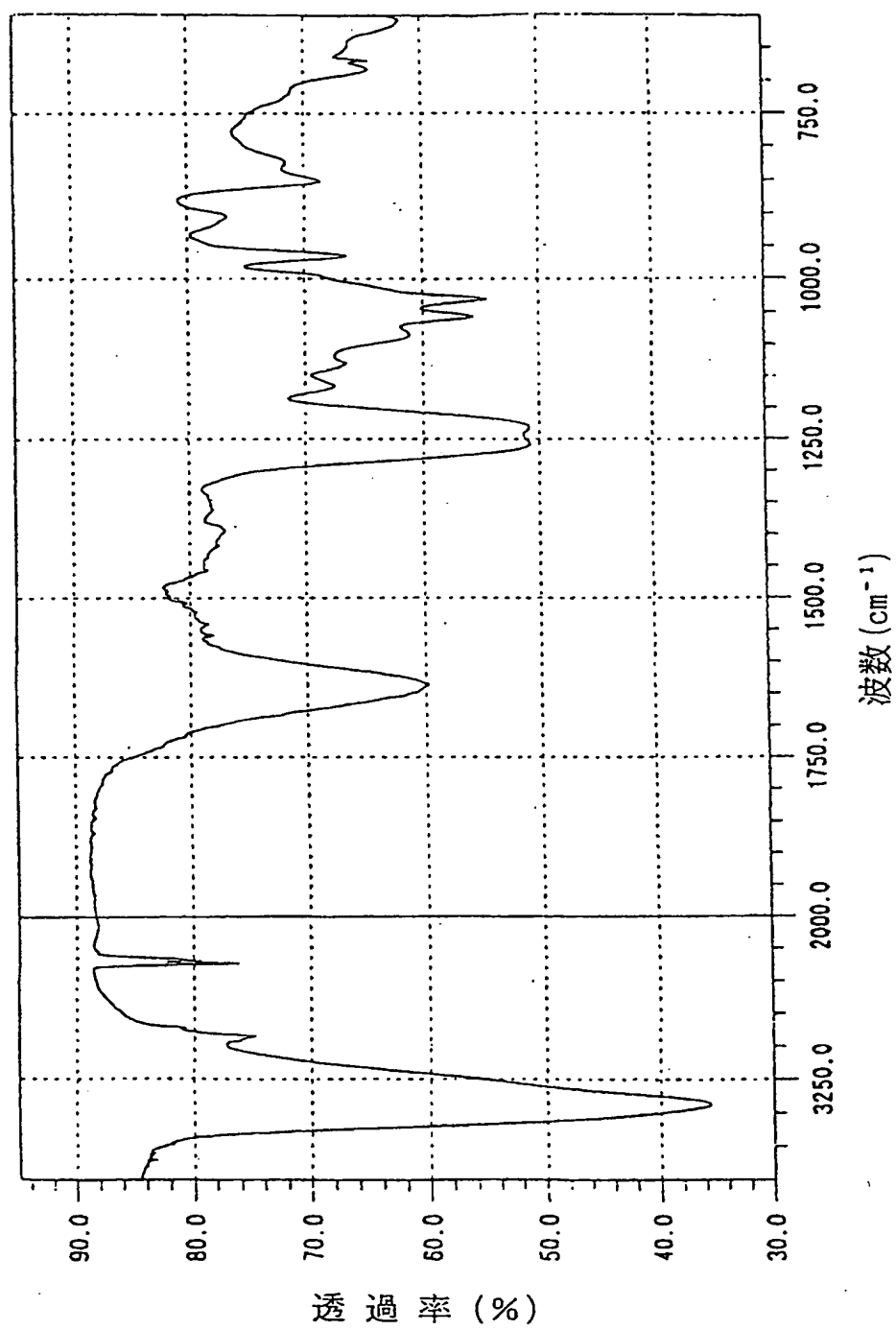


図 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/00606

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C08B37/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C08B37/00	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)	

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-301772, A (Nippon Oil Co., Ltd.), 19 November, 1996 (19. 11. 96) (Family: none)	1-14
A	JP, 4-298501, A (Nisshinbo Industries, Inc.), 22 October, 1992 (22. 10. 92) (Family: none)	1-14
A	JP, 8-92303, A (Showa Sangyo Co., Ltd.), 9 April, 1996 (09. 04. 96) (Family: none)	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search  
5 April, 1999 (05. 04. 99)

Date of mailing of the international search report  
20 April, 1999 (20. 04. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/00606

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C08B37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 8-301772, A (日本石油株式会社), 19.11月.1996 (19.11.96), (ファミリーなし)	1-14
A	J P, 4-298501, A (日清紡績株式会社), 22.10月.1992 (22.10.92), (ファミリーなし)	1-14
A	J P, 8-92303, A (昭和産業株式会社), 9.4月.1996 (09.04.96), (ファミリーなし)	1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.04.99

国際調査報告の発送日

20.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘實 謙二



4 P

7433

電話番号 03-3581-1101 内線 6608